

СОЗДАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *BIRC5* И *HER-2/neu* С ПОМОЩЬЮ ПЦР С ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ И ОЦЕНКА ИХ ЭФФЕКТИВНОСТИ

**СЕМЕНОВ В.М., ПОБЯРЖИН В.В., ПАШИНСКАЯ Е.С., ЕГОРОВ С.К.,
ГОРБАЧЕВ В.В., КОСОВА М.С.**

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск,
Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2021. – Том 20, №2. – С. 65-70.

THE DEVELOPMENT OF TEST SYSTEMS FOR DETERMINING THE EXPRESSION OF THE *BIRC5* AND *HER-2/neu* GENES IN LABORATORY ANIMALS USING PCR WITH FLUORESCENCE DETECTION AND EVALUATION OF THEIR EFFECTIVENESS

SEMENOV V.M., PABIARZHYN V.V., PASHINSKAYA E.S., EGOROV S.K., GORBACHEV V.V., KOSOVA M.S.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2021;20(2):65-70.

Резюме.

Цель – разработать праймеры и зонды для детекции экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* и оптимизировать реакции с последующим созданием тест-систем ПЦР с флюоресцентным методом детекции.

Материал и методы. Достижение поставленной цели включало 5 этапов, в результате проведения которых были созданы две тест-системы для определения экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* методом ПЦР в режиме реального времени в эксперименте.

Результаты. Были разработаны две тест-системы для определения у лабораторных животных экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* с помощью ПЦР с флюоресцентной детекцией, которые обладают высокой чувствительностью и эффективностью.

Заключение. Разработанные тест-системы могут применяться для определения изменения экспрессии заявленных генов при проведении экспериментов биологического, ветеринарного и медицинского профилей.

Ключевые слова: *BIRC5* и *HER-2/neu*, эксперимент, экспрессия, крысы.

Abstract.

Objectives. To develop primers and probes for detecting the expression of the *BIRC5* and *HER-2/neu* genes and to optimize the reactions with the subsequent creation of PCR test systems with a fluorescent detection method.

Material and methods. Achieving this goal included 5 stages, as a result of which two test systems were developed to determine the expression of the *BIRC5* and *HER-2/neu* genes by real-time PCR in the experiment.

Results. Two test systems for determining the expression of the *BIRC5* and *HER-2/neu* genes in laboratory animals by means of PCR with fluorescence detection have been developed, that are highly sensitive and effective.

Conclusions. The developed test system can be used for determining changes in the expression of the given genes during experiments of biological, veterinary and medical profiles.

Key words. *BIRC5* and *HER-2/neu*, experiment, expression, rats.

Сурвивин – это белок, бакуловирусный ингибитор апоптоза, кодирующийся геном *BIRC5*, обнаруживающийся как у позвоночных, так и у беспозвоночных. Изменение уровней экспрессии сурвивина находится под контролем клеточного цикла. Известно, что гиперэкспрессия *BIRC5* отмечается в тканях зародышей в период эмбрионального развития и фиксируется в большинстве опухолей [1, 2]. При сравнительном исследовании экспрессии сплайс-вариантов мРНК сурвивина, сурвивина-2В и сурвивина-DeltaEx3 в биоптатах фиброаденомы, рака молочной железы и метастатических лимфатических узлов, по сравнению с контролем, выявлено, что во всех образцах наблюдается его гиперэкспрессия. Кроме того, показано, что экспрессия сурвивина является неблагоприятным прогностическим фактором при различных онкологических заболеваниях [3, 4].

В современной научной литературе подчеркивается тот факт, что *BIRC5* может выступать в роли синергиста с другими онкогенными белками. Так, в ряде исследований показано, что при раке молочной железы с гиперэкспрессией *ErbB2* уровень сурвивина корреляционно увеличивается, что сопровождается угнетением апоптоза [5-7].

Кроме сурвивина важную роль в онкогенезе играет трансмембранный гликопротеин *HER2/neu* – представитель семейства рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR). Основная роль этих гликопротеинов состоит в нормальном развитии и дифференцировке клеток. Гиперэкспрессия *HER-2/neu* наблюдается в 10-34% случаев рака молочной железы, кишечника, причем данный процесс в 90-95% случаев является результатом амплификации *c-ERBB2*. Известно, что гиперэкспрессия *HER2/neu* корреляционно связана с неблагоприятным прогнозом. В настоящее время учеными проводятся научные исследования в отношении роли гиперэкспрессии *HER2/neu* при постановке диагноза, лечении гормонзависимого рака, процессах регионарного метастазирования [8, 9].

В то же время до настоящего времени не разработаны тест-системы для определения экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* методом ПЦР в режиме реального времени, позволяющие проводить исследования у экспериментальных животных с инплантированными опухолями. Создание подобных тест-систем позволит расширить научные исследования по влиянию различных, в том числе и биологических факторов на онкогенез.

Цель – разработать праймеры и зонды для детекции экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* и

оптимизировать реакции с последующим созданием тест-систем ПЦР с флуоресцентным методом детекции.

Материал и методы

Работа включала следующие этапы:

1. Нахождение и анализ последовательностей кодирующих *BIRC5* и *HER-2/neu*.
2. Расчет наборов праймеров и флуоресцентных проб для найденных последовательностей.
3. Оценка возможности их использования с диагностической целью.
4. Создание и апробация режимов протекания полимеразной цепной реакции (температура, количество циклов, концентрации реагентов) с полученными праймерами.
5. Проверка способов определения в биологических жидкостях с учётом контрольных образцов.

Были использованы праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие размер от 15 до 30 нуклеотидов, идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени, играющие ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации, без димеров и петель, при этом область отжига праймеров находилась вне зон мутаций, делеций или инсерций.

Также были созданы ДНК-зонды, искусственно синтезированные олигонуклеотиды небольшого размера (30-34 нуклеотидов), комплементарные специфическим ампликонам. Благодаря прикрепленным к ним флуоресцентным меткам, ДНК-зонды использовали для детекции продуктов реакции. Проводили оценку возможных диагностически значимых участков генома.

Поиск геномов *BIRC5* и *HER-2/neu* осуществляли в базе данных GenBank Национального Центра Биотехнологической Информации США (GenBank NCBI USA) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>]. Поиск нуклеотидных последовательностей, гомологичных заданной, осуществляли методом глобального попарного выравнивания (global pairwise alignment) с помощью программ Clustal Omega и Ugene.

При этом поиск участков, наиболее общих для всех найденных индивидуальных последовательностей (консервативных участков), а также участков каждой последовательности, присущих только одной из них (вариабельных и уникальных участков) проводили с применением глобального множественного выравнивания (global multiple

alignment) для подбора участков нуклеотидных последовательностей, которые использовали в качестве прямого и обратного праймеров.

Выбор оптимальных праймеров и зондов осуществляли с учетом размера (длины) ампликона, температуры отжига, нуклеотидного состава, распределения нуклеотидов по длине праймера, возможности образования праймерами шпилек и димеров с применением программ Primer-BLAST / Primer3, FastPCR.

Кроме того, осуществляли проверку выбранных последовательностей праймеров на специфичность отжига. Так как праймеры, даже в случаях абсолютной уникальности для тех или иных последовательностей ДНК, в ряде случаев могут отжигаться и на неспецифичных участках, не относящихся к анализируемому гену, проводили проверку соответствия праймеров последовательностям целевого гена. С этой целью использовали on-line сервис NCBI Primer BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>], что позволило и оценить локальное попарное выравнивание каждого из праймеров со всеми нуклеотидными последовательностями из баз данных Refseq и пр.

Для выделения ДНК из биологического материала применяли преципитационный метод.

Для подтверждения полученного результата проводили эксперимент, состоящий из 5 серий. Манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, нормативной документацией ВГМУ, требованиями биомедицинской этики.

Животные первой серии были здоровыми (10 голов). У них биоптаты тканей забирали однократно (печень, легкие, головной мозг) и определяли экспрессию сурвивина. У самок крыс второй («контроль с опухолью») и третьей серий («глиома в сочетании с аскаридозом», заражение в дозе 40 яиц *Ascaris suum* на 1 грамм массы тела животного) моделировали опухоль глиомы C6 in situ [10].

У животных второй серии забирали материал на 35-е сутки развития опухоли, а у самок третьей серии на 28-е сутки после заражения (35-е сутки развития опухоли). В образцах тканей (опухоль, печень, легкие, головной мозг) первой и второй серии проводили определение экспрессии сурвивина.

Результаты первой, второй, третьей серий сравнивали между собой.

Четвертую серию проводили для опреде-

ления экспрессии эпидермального фактора роста (*ErbB-2/HER2-Neu*) в тканях 10 здоровых самок крыс (контроль). Забор материала (печень, селезенка, легкие, головной мозг) проводили однократно.

Пятая серия осуществлялась с целью определения экспрессии эпидермального фактора роста (*ErbB-2/HER2-Neu*) в тканях 10 перорально инвазированных самок крыс после их заражения инвазионной культурой *T. gondii* в дозе 50 тахизоитов на 1 г массы тела животного (10000 тахизоитов на самку). У крыс на 42-е сутки после заражения проводили забор материала (печень, селезенка, легкие, головной мозг). Результаты четвертой и пятой серии сравнивали между собой.

Сравнительная экспрессия изучаемых генов была проведена после нормализации каждого из образцов к уровню контрольных генов *GAPDH* и *ACTIN-β*. Анализ экспрессии проводился с использованием программы qbase+ и CFX Maestro.

Различия между группами оценивали по критерию Манна-Уитни (Mann–Whitney, U-test) и считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Обработку данных проводили с помощью программы Statistica 12.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований были созданы две тест-системы для определения экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* методом ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию проводили на приборе CFX 96 (Biorad, США). На основании выбранных в процессе экспериментов оптимальных параметров, а также времени и температур для всех стадий амплификации был обозначен режим проведения ПЦР с флуоресцентной детекцией для созданных тест-систем (табл. 1).

Разработанные тест-системы предназначены для определения фрагментов генов *BIRC5* и *HER-2/neu* в биологических субстратах, для использования с термоциклерами, способными работать с пробами объемом 25 мкл и регистрировать FAM/ROX флуоресценцию (CFX96, Rotor-Gene, ДТ-48 и др.).

В результате проведенных сравнительных испытаний и расчета чувствительности установлена 100% чувствительность и специфичность созданных тест-систем.

Таблица 1 – Условия амплификации для экспрессии генов *BIRC5* или *HER-2/neu*

Этап	Температура	Время	Число повторов
Активация Taq-полимеразы	95°C	4:00 мин	1
Плавнение (денатурация)	95°C	0:30 мин	45
Отжиг/элонгация/детекция флуоресцентного сигнала (FAM/ROX)	59°C	1:00 мин	

Таблица 2 – Характеристика тест-системы для определения экспрессии генов *BIRC5*

Характеристики	Образец	Производительность
Аналитическая чувствительность	Синтетическая ДНК Сурвивина	≥5 копий за пробег
Линейный диапазон	Синтетическая ДНК Сурвивина	>5 логарифмов

Таблица 3 – Характеристика тест-системы для определения экспрессии генов обнаружения *HER-2/neu*

Характеристики	Образец	Производительность
Аналитическая чувствительность	Синтетическая ДНК <i>HER-2/neu</i>	≥5 копий за пробег
Линейный диапазон	Синтетическая ДНК <i>HER-2/neu</i>	>5 логарифмов

Таким образом, разработанные тест-системы для определения экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* имеют показатели, позволяющие их использовать для проведения научных исследований, посвященных изучению онкогенеза (табл. 2, 3).

Это доказывают экспериментальные данные. В группе контрольных здоровых (серия №1) животных в тканях лёгких, печени, мозга экспрессии гена *BIRC5* не обнаружено.

В материале второй серии («контроль с опухолью»), опухоль, печень, легкие, головной мозг), забранном на 35-е сутки после введения опухолевой культуры С6, были зафиксированы следующие показатели: экспрессия сурвивина (*BIRC5*) в ткани глиомы (опухоль) – 0,35 (95% ДИ: 0,23-0,54) относительных единиц.

В тканях лёгких, печени, мозга экспрессии гена *BIRC5* обнаружено не было.

Результаты исследования биологического материала, полученного от животных третьей серии (заражение 40 яиц *A. suum* на 1 г массы тела животных), показали, что в ткани опухоли экспрессия сурвивина (*BIRC5*) на 28-е сутки после инвазии составила 0,66 (95% ДИ: 0,55-0,79) относительных единиц. Полученные данные достоверно отличались от серии №1 («контроль с опухолью») в сторону повышения на всех сроках развития паразита ($p=0,019-0,049$).

В легких у животных серии №3 экспрессия сурвивина (*BIRC5*) отмечена к 28-м суткам на

уровне 0,045 (95% ДИ: 0,028-0,072) относительных единиц. Отмечались отличия результатов животных серии №3 в сторону увеличения как от результатов неинвазированных животных с глиомой, так и здоровых ($p=0,0001$).

В биоптатах печени уровень сурвивина также возрос по сравнению с первой, второй сериями и составил к 28-м суткам 0,028 (95% ДИ: 0,015-0,053) относительных единиц ($p=0,0001-0,0003$).

Анализ статистической значимости различий экспрессии сурвивина в мозге животных инвазированных самок показал ее рост на всех сроках наблюдения по сравнению с сериями сравнения №1, №2 и составил на 28-е сутки 0,016 относительных единиц (95% ДИ: 0,0074-0,036) ($p=0,0001-0,0003$).

В свою очередь, при определении *ErbB-2/HER2-Neu* у животных серии №4 (здоровые) в тканях лёгких, печени, селезенки, мозга экспрессии гена *ErbB-2/HER2-Neu* не выявлено.

В образцах пятой серии (инвазия в дозе 50 тахизоитов токсоплазм на 1 г массы тела животного, 10000 тахизоитов на самку, легкие, печень, селезенка, головной мозг), забранных на 42-е сутки развития паразита, была зафиксирована экспрессия в ткани легких *ErbB-2/HER2-Neu* на 42-е сутки – 0,546 (95% ДИ: 0,503-0,589) относительных единиц, в печени экспериментальных животных – 0,357 (95% ДИ: 0,280-0,434) относительных единиц, в селезенке крыс – 0,440 (95%

ДИ: 0,399-0,480) относительных единиц, в головном мозге – 0,152 (95% ДИ: 0,113-0,190) относительных единиц.

Выявлено, что экспрессия *ErbB-2/HER2-Neu* достоверно выше результатов экспрессии здоровых животных на всех сроках развития токсоплазм во всех изучаемых органах ($p=0,0051$).

Заключение

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что разработанные тест-системы для определения у лабораторных животных экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* с помощью ПЦР с флюоресцентной детекцией обладают высокой чувствительностью и эффективностью и могут применяться для определения изменения экспрессии заявленных генов при проведении экспериментов биологического, ветеринарного и медицинского профилей.

Литература

1. Dallaglio K, Marconi A, Pincelli C. Survivin: a dual player in healthy and diseased skin / K. Dallaglio, A. Marconi, C. Pincelli // J. Invest. Dermatol. – 2012 Jan. – Vol. 132, N 1. – P. 18–27.
2. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel

target for cancer therapeutics / A. C. Mita [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2008 Aug. – Vol. 14, N 16. – P. 5000–5005.

3. Survivin promotes glioma angiogenesis through vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in vitro and in vivo / P. Wang [et al.] // Mol. Carcinog. – 2012 Jul. – Vol. 51, N 7. – P. 586–595.
4. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF / J. Tran [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002 Apr. – Vol. 99, N 7. – P. 4349–4354.
5. Margueron R. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life / R. Margueron, D. Reinberg // Nature. – 2011 Jan. – Vol. 469, N 7330. – P. 343–349.
6. Breast cancer statistics / C. E. DeSantis [et al.] // CA Cancer. J. Clin. – 2013 Jan-Feb. – Vol. 64, N 1. – P. 31–42.
7. Breast cancer incidence rates in U.S. women are no longer declining / C. DeSantis [et al.] // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2011 May. – Vol. 20, N 5. – P. 733–749.
8. Study protocol for Young & Strong: a cluster randomized design to increase attention to unique issues faced by young women with newly diagnosed breast cancer / M. L. Greaney [et al.] // BMC Public Health. – 2015 Jan. – Vol. 31, N 15. – P. 37.
9. Pegram, M. D. Combined biological therapy of breast cancer using monoclonal antibodies directed against HER2/neu protein and vascular endothelial growth factor / M. D. Pegram, D. M. Reese // Semin. Oncol. – 2002 Jun. – Vol. 29, N 3, suppl. 11. – P. 29–37.
10. Пашинская, Е. С. Способ воспроизведения экспериментальной крысиной глиомы C6 in situ / Е. С. Пашинская, В. В. Побяржин // Мед.-биол. проблемы жизнедеятельности. – 2019. – № 2. – С. 50–54.

Поступила 15.02.2021 г.

Принята в печать 15.04.2021 г.

References

1. Dallaglio K, Marconi A, Pincelli C. Survivin: a dual player in healthy and diseased skin. J Invest Dermatol. 2012 Jan;132(1):18-27. doi: 10.1038/jid.2011.279
2. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. Clin Cancer Res. 2008 Aug;14(16):5000-5. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0746
3. Wang P, Zhen H, Zhang J, Zhang W, Zhang R, Cheng X, et al. Survivin promotes glioma angiogenesis through vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in vitro and in vivo. Mol Carcinog. 2012 Jul;51(7):586-95. doi: 10.1002/mc.20829
4. Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Apr;99(7):4349-54. doi: 10.1073/pnas.072586399
5. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. Nature. 2011 Jan;469(7330):343-9. doi: 10.1038/nature09784

6. DeSantis CE, Fedewa SA, Sauer AG, Kramer JL, Smith RA, Jemal A. Breast cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2016 Jan-Feb;66(1):31-42. doi: 10.3322/caac.21320
7. DeSantis C, Howlader N, Cronin KA, Jemal A. Breast cancer incidence rates in U.S. women are no longer declining. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011 May;20(5):733-9. doi: 10.1158/1055-9965
8. Greaney ML, Sprunck-Harrild K, Ruddy KJ, Ligibel J, Barry WT, Baker E, et al. Study protocol for Young & Strong: a cluster randomized design to increase attention to unique issues faced by young women with newly diagnosed breast cancer. BMC Public Health. 2015 Jan;15:37. doi: 10.1186/s12889-015-1346-9
9. Pegram MD, Reese DM. Combined biological therapy of breast cancer using monoclonal antibodies directed against HER2/neu protein and vascular endothelial growth factor. Semin Oncol. 2002 Jun;29(3 Suppl 11):29-37. doi: 10.1053/sonc.2002.34053
10. Pashinskaia ES, Pobiarzhin VV. A way to reproduce experimental rat glioma C6 in situ. Med-Biol Problemy Zhiznedeiatiel'nosti. 2019;(2):50-54. (In Russ.)

Submitted 15.02.2021

Accepted 15.04.2021

Сведения об авторах:

Семенов В.М. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;
Побяржин В.В. – к.б.н., доцент кафедры биологии и фармацевтической ботаники, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;
Пашинская Е.С. – к.б.н., доцент кафедры биологии и фармацевтической ботаники, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;
Егоров С.К. – к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;
Горбачев В.В. – ассистент кафедры инфекционных болезней с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;
Косова М.С. – аспирант кафедры инфекционных болезней с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

Information about authors:

Semenov V.M. – Doctor of Medical Sciences, professor, head of the Chair of Infectious Diseases with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;
Pabiarzhyn V.V. – Candidate of Biological Sciences, associate professor of the Chair of Biology & Pharmaceutical Botany, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;
Pashinskaya E.S. – Candidate of Biological Sciences, associate professor of the Chair of Biology & Pharmaceutical Botany, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;
Egorov S.K. – Candidate of Medical Sciences, associate professor of the Chair of Infectious Diseases with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;
Gorbachev V.V. – lecturer of the Chair of Infectious Diseases with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;
Kosova M.S. – postgraduate of the Chair of Infectious Diseases with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра биологии и фармацевтической ботаники. E-mail: tulovo22@rambler.ru – Побяржин Вячеслав Войтехович.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210009, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Biology & Pharmaceutical Botany. E-mail: tulovo22@rambler.ru – Viachaslau V. Pabiarzhyn.